

疫病罹病・疫病菌培養濾液処理ジャガイモ組織の 電子顕微鏡による観察

山本昌木[※]・野津幹雄[※]・荒瀬 榮^{※※}・重光善弘^{※※※}

Masaki YAMAMOTO, Mikio Nozu, Sakae ARASE and Yoshihiro SHIGEMITSU

Ultra-structure of potato tissues infected with *Phytophthora*
infestans and treated with its culture filtrate

はじめに

Phytophthora infestans に対するジャガイモの抵抗性に関しては種々の立場から検討されている。*P. infestans* の侵入初期における感受体細胞の反応については¹⁾ 富士²⁾・山本らにより光学顕微鏡で観察された。³⁾ 梶原は電子顕微鏡で観察し、親和性レースでは侵入菌糸と感受体細胞質との間に比較的明瞭な sheath を生じるが、非親和性レースでは sheath はほとんどの場合生じないと報告した。

本報告はジャガイモ疫病抵抗性機作の解明を目的に企画された研究の一部であり、電子顕微鏡による2, 3の観察結果を述べたものである。

実験材料と方法

自然発生したジャガイモ疫病罹病葉：農林1号、カタールディーン、男爵薯の罹病葉で病葉裏面に分生胞子を着生している組織を用いた。培養濾液として、*P. infestans* 菌レース1を酒井氏液体培地に20°C、30日間培養し、菌そうを取り除いたものを用いた。培養濾液を農林1号と種間雑種1506-b(9)の複葉の切口から吸収させ、複葉に生じたえ死斑部を観察した。これらの組織は6.25% グルタルアルデヒドリン酸緩衝液(pH 7.4)で4°C、4時間固定し、リン酸緩衝液で洗浄したのち、1%オスミック酸-リン酸緩衝液(pH 7.4)で3時間固定した。水洗後エタノール系列で脱水し、プロピレンオキシドを通してエポンに包埋した。超薄切片は日本電子JUM-5B型ウルトラミクロトームで作製した。切片は4%酢酸ウラニールで電子染色し、日立

HS-6型電子顕微鏡で観察した。

結 果

1. 健全葉肉組織細胞の微細構造

農林1号、種間雑種1506-b(9)の健全葉肉組織の細胞は図1に示すように、細胞内には核、葉緑体、ミトコンドリアなどの細胞内器官が認められた。葉緑体にはグラナメラやインターグラナメラのほか、好オスミウム性顆粒や澱粉が認められた。核は外膜と内膜の2重膜によって囲まれており、内膜付近にはクロマチンが認められ、核の中央部には仁が認められた。これら細胞内器官のほか小胞体(ER)や単位膜によって囲まれ、内部に結晶構造をもったマイクロボディが存在していた。

2. 疫病罹病組織内の菌糸の微細構造

ジャガイモ葉肉組織(農林1号、男爵薯、カタールディーン)へ侵入した菌糸の細胞壁は内外2層から形成されており、外層は内層に比較して電子密度が高く、薄いことが認められた(図2)。菌糸の細胞壁は感受体の細胞壁より電子密度が低く、厚さも薄い場合が多い。菌糸の原形質内にはミトコンドリアが認められた。そのほか脂質と思われる好オスミウム性顆粒、液胞、核が存在していた。ミトコンドリアのクリステはチューブ状である(図3)。

3. *Phytophthora infestans* 菌の感受体細胞への侵入。

ジャガイモ葉肉組織内に侵入した菌糸と感受体細胞の細胞壁の接触部には、粘質様物質が観察できる(図3, 4)。細胞間隙に侵入した菌糸が感受体細胞壁と密着したところで病原菌と感受体の両細胞壁の境界が不明になっている場合がある。細胞間隙に蔓延した菌糸はその一

※ 植物病学研究室
※※ 山口県日置農業改良普及所
※※※ 備前市役所

部が枝分かれ状になって感受体細胞内へ侵入し、菌糸が感受体細胞壁貫通の際には図4, 6, 7のように元来の菌糸の太さより細くなる。感受体細胞内へ侵入した菌糸は図4に見られるように、組織内に蔓延する菌糸(図2・3)に比較して直径が細いことが認められる。図4・8に示されるように、感受体細胞内へ侵入した初期の菌糸は感受体細胞の液胞内には認められない。

4. *Phytophthora infestans* 菌感染に伴う感受体細胞の変化

a. 細胞壁の変化

病原菌の侵入を受けたジャガイモ組織細胞の細胞壁が菌糸により変化することは図4-7から明らかである。菌糸と接触した感受体細胞壁はわん曲する場合がある。またカロンチー様の構造も認められた(図6)。

b. 細胞質および細胞膜の変化

菌糸の侵入または接触により、感受体細胞壁が消失した部分では感受体細胞膜の存在は認められなかった。侵入菌糸の周辺部に多数の小胞が認められるものもあった。感染を受けた感受体細胞の細胞質基質(図4, 8)は健全葉の細胞質基質(図1)に比較して電子密度が低いようである。罹病組織細胞の多くは原形質分離を起していた(図3)。

c. 葉緑体の変化

健全ジャガイモ葉の葉緑体は図1に示すように、グラナメラ、インターグラナメラが認められる。好オスミウム性顆粒は少なく、直径が小さい。また澱粉粒の大きさも小さい。これに比較して、罹病組織でも病原体が侵入していないと思われる感受体細胞の葉緑体には大型の澱粉粒が存在する場合が多い。また葉緑体の膨潤も少なく、好オスミウム性顆粒も少なく、小さい(図11)。病原菌の侵入を受けた細胞の葉緑体には多数の大型オスミウム性顆粒の出現が見られた。このような葉緑体では澱粉粒の蓄積は見られず、図12-16に示すような変化が見られた。すなわち葉緑体の基質の電子密度が高くなっているもの、葉緑体膜が消失して基質が葉緑体の外へ流れ出ていると思われるものが見られた(図10, 13)。葉緑体膜が消失した葉緑体ではグラナメラの間隙が広がり、小胞のような状態を示した(図12, 15, 16)。

d. ミトコンドリアの変化

健全組織細胞のミトコンドリアにはミトコンドリア膜やクリステが認められる(図1)。しかし罹病組織においてはクリステが不明瞭になったものが多い(図4, 8, 14)。感染末期と思われる組織の細胞ではミトコンドリア膜が不明瞭になっているものも認められた。

e. マイクロボディーの変化

マイクロボディーは病原菌の感染に伴い単位膜が消失し、基質が細胞質内へ流失してしまい、結晶構造だけが残っている像が認められる(図10)。

5. *P. infestans* 菌培養濾液によるジャガイモ組織細胞の変化

ジャガイモ疫病菌 Race 1 を酒井氏液体培地で培養し、その培養濾液で処理すると農林1号、種間雑種1506-(b)9の塊茎スライスに游走子を接種した時と同じような褐変を誘起する。またジャガイモ複葉に培養濾液を吸収させると処理後約24時間で葉脈に沿ってえ死斑を生じ、葉の周辺部(葉縁)から萎凋をおこす。

培養濾液処理した葉肉組織細胞の葉緑体では葉緑体膜の消失は認められず、また葉緑体内には大型の好オスミウム性顆粒も認められなかった。両品種のジャガイモ細胞においてトノプラスト(T)の破れた細胞が認められる場合もあった。ミトコンドリアの膜、マイクロボディーの膜、核膜においても破損は認められなかった。種間雑種1506-b(9)の葉肉組織の細胞壁周辺部には図19, 20のような高電子密度の物質が沈着しているのが認められた。農林1号ではこのような沈着物は認められなかった。

考 察

感受体細胞壁に接触した菌糸の周辺部には粘質様物質^{4,5)}が認められるが、このような現象は他の菌類と感受体の関係においても認められており、病原菌と感受体とが接触した場合かなり普遍的に見られる現象であると思われる。また感受体の細胞壁はわん曲したり、粘質様物質によって感受体細胞壁が病原菌に引きよせられたような像も認められることから、菌糸の感受体細胞への侵入前にかんがりの変化が起こるように思われる。

糸状菌の微細構造については種々の菌類^{6,7)}で研究がなされている。ジャガイモ疫病菌の場合、例えば、図3, 5, 6に示すような原形質内に小胞状の液胞が数多く見られた。これは山本ら¹³⁾がジャガイモ疫病菌分生胞子において観察したベシクルに似ている。

ジャガイモ疫病菌の菌糸が感受体細胞内へ侵入する場合、菌糸の周辺に高電子密度の物質が出現し、侵入初期と思われる場合に多量に存在する。

病原菌の侵入に伴い植物細胞はいずれ死に至るが、その過程で、とくに黄化を伴う葉の病気では葉緑体に顕著な微細構造の変化が認められている。ジャガイモ疫病菌の侵入を受けたジャガイモ葉肉組織の細胞においても、葉緑体の著しい変化が見られた。すなわち病斑部および病斑部周辺組織に澱粉⁸⁾が集積することが知られているが

疫病菌感染葉においても図11のように大型澱粉の蓄積した葉緑体を観察した。このような葉緑体をもった細胞はまだ病原菌の侵入を受けていない。

病原菌の侵入を受けた感受体細胞の葉緑体は膨潤とそれに伴うラメラ間隙の広がり、好オスミウム性顆粒の増加、葉緑体膜の消失などの現象が見られる。このような葉緑体の変化はイネごま葉枯病やキュウリ灰色かび病で観察された葉緑体の変化とよく似ている。健全葉の葉緑体の好オスミウム性顆粒は過剰脂質の貯蔵またはグラナラメラの分解産物でラメラ構造の退化に伴いその数が増加することが知られている。¹⁰⁾ ジャガイモ疫病菌罹病葉においても好オスミウム性顆粒が増加することを認めたが、このことは感染によるラメラ系の退化・変性産物が好オスミウム性顆粒の異常増加となって現われたものと考える。¹¹⁾ LUKEらは *Helminthosporium victoriae* の毒素によるエンバクの葉緑体について述べ、堀野はイネごま葉枯病罹病組織の葉緑体の変化は *Cochliobolus miyabeanus* の産生毒素によるものと推論した。*P. infestans* 菌の培養濾液処理したジャガイモ葉においては疫病菌感染葉に見られた葉緑体の変化は認められなかった。核やマイクロボディーの膜も存在していた。培養濾液処理により種間雑種 1906-(b)9 の細胞壁周辺部に高電子密度の物質の沈着が見られるが病原菌と感受体関係の特異性を示す物質の培養濾液中の存否に関しては検討中である。¹²⁾

図の説明

- 図1. 健全ジャガイモ葉肉組織の細胞。細胞内には核(N), ミトコンドリア(M), 液胞(V), 葉緑体(CH)などの細胞内器官が認められる。×12000
- 図2. 罹病組織の細胞間隙における菌糸の横断像。菌糸の細胞には小胞体, ミトコンドリア, 脂質球が認められる。感受体細胞の葉緑体内の好オスミウム性顆粒の形は増大している。×12000
- 図3. 罹病組織の細胞間隙における菌糸。菌糸細胞にはミトコンドリア, 小胞体, 液胞が認められる, ミトコンドリアのクリステはチューブ状である。なお感受体細胞は原形質分離を起こしている。×12000
- 図4. ジャガイモ疫病菌の感受体細胞への侵入。菌糸は感受体細胞壁を貫通して侵入する。侵入菌糸にはミトコンドリア, 小胞体が認められる。感受体内の菌糸周辺には高電子密度の物質が認められる。×12000
- 図5. 6. 7. ジャガイモ疫病菌の感受体細胞への侵入。菌糸が侵入する場合, 感受体細胞壁の変形や細胞内構造の変化が起こる。

図5, 6 ×8000 図7 ×8000

- 図8. 感受体細胞内の菌糸。菌糸周辺の感受体細胞質には多数の小胞が認められる。なお感受体細胞へ菌糸が侵入した時点ではミトコンドリア(M)やマイクロボディー(MB)の外膜は消失していない。×8800
- 図9. 核基質の電子密度の低下を起こした感受体細胞の核。×8000
- 図10. 罹病組織細胞のマイクロボディー。マイクロボディーは外膜を消失し, 結晶構造が残る。×10000
- 図11. 罹病組織細胞の葉緑体。侵入菌糸が認められない細胞内の葉緑体には多量の澱粉が認められる場合が多い。×12000
- 図12. 罹病組織細胞の葉緑体。葉緑体は膨潤し, 葉緑体膜が一部消失し, 葉緑体内の好オスミウム性顆粒は増大する。×10000
- 図13. 14. 罹病組織細胞の葉緑体とミトコンドリア。罹病組織の細胞には好オスミウム性顆粒の増大した葉緑体や葉緑体膜が消失した葉緑体が見られる。またミトコンドリアのクリステが少なくなる場合もある。×10000
- 図15. 16. 罹病組織細胞の葉緑体の膨潤。小胞状構造はグラナラメラ(シラコイド)が膨潤したものであろう。図15 ×10000 図16 ×14000
- 図17. 罹病組織細胞と葉緑体。葉緑体が膨潤する場合はトノプラストが消失していることが多い。×12000
- 図18. 罹病組織細胞の核。変性したと思われる細胞には高電子密度の物質を持った核が存在する場合もある。×8000
- 図19. 疫病菌培養濾液処理した種間雑種 1506-b(9)の葉肉細胞。トノプラストや細胞膜が消失し, 細胞質の変性が起こる。×10000
- 図20. 培養濾液処理した種間雑種 1506-b(9)の葉肉細胞。細胞壁の外側に高電子密度の物質が沈着する場合がある。×10000

図中の記号

CH 葉緑体 CW 感受体細胞壁 ER 小胞体 IH 侵入菌糸 M ミトコンドリア MUS 粘質様物質 N 核 NM 核膜 NU 仁 OS 好オスミウム性顆粒 ST 澱粉粒 T トノプラスト V 液胞

摘 要

ジャガイモ疫病菌感染葉組織とジャガイモ疫病菌の培養濾液処理葉組織を電子顕微鏡で観察した。

ジャガイモ疫病菌菌糸の細胞壁は内外2層よりなり、外層は内層より電子密度が高く菌糸内にはミトコンドリア

ア、核、小胞体、液胞、脂質球が存在していた。感染葉組織において菌糸は感受体の細胞間隙、感受体細胞内に認められた。細胞間隙の菌糸と感受体細胞の接触部には粘質様物質が見られた。菌糸が感受体細胞に侵入した場合、感受体細胞内の菌糸周辺部には常に高電子密度の物質が認められた。感受体細胞内の構造が崩壊した場合をのぞいて、菌糸は感受体細胞内の液胞には認められなかった。すなわち侵入菌糸は感受体の細胞質にとり囲まれていた。菌糸が侵入した感受体の細胞では原形質分離を起こしたものがあつた。感染組織内の核は核基質の電子密度が健全核のそれに比べて低かつた。また核膜が消失する核もあつた。感染組織細胞の葉緑体では多量の澱粉の蓄積、葉緑体膜の消失、ラメラ間隔の広がり、好オスミウム性顆粒の増大などが認められた。ミトコンドリアではクリステが不明瞭になり、マイクロボディは外膜が消失し、結晶構造だけになつた。疫病菌培養濾液は農林1号と種間雑種 1506-b (9) の塊茎には褐変、複葉にはえ死斑を生じさせる毒性を示した。両品種の葉肉細胞ではトノプラストの破損が見られ、種間雑種 1506-b (9) の細胞壁周辺には電子密度の高い物質が認められた。

引用文献

1. 富山宏平：日植病報 **21** : 54-62, 1956.
2. 山本昌木：島根農大植病研特報 **1** : 1-151, 1961.
3. 梶原敏宏：感染機作研究における光顕と電顕観察との対比ならびに機能へのアプローチ 日本植物病理学会感染機作研究談話会 (第5回) 24-33, 1971.
4. 福富雅夫・赤井重恭・白石雅也：細胞 **3** (4) : 18-26, 1971.
5. 石田紀郎：宿主病原菌相互作用へのアプローチ 日本植物病理学会植物病理化学談話会主催夏の学校 14-30, 1967.
6. AKAI, S., FUKUTOMI, M. and KUNOH, H.: *Mycopathol. et Mycol. Appl.* **35** (3-4) : 217-222, 1968.
7. 堀野 修：電子顕微鏡によるイネのごま葉枯病の病理解剖学的研究、とくに病原菌と寄生細胞の微細構造に関する観察 (学位論文) 1-136, 1971.
8. 田中寛康：水稻ごま葉枯病病斑周縁部のでんぷん蓄積機構 京大植物病理学研究室業績特別発表15号 1-121, 1962.
9. 白石雅也：灰色かび病菌 (*Botrytis cinerea* Per.) の寄主体感染に関する電子顕微鏡的研究 (学位論文) 1-114, 1972.
10. 植田利喜造・犀川政稔：細胞 **1** (2) : 2-11, 1969.
11. LUKE, H. H., WARMKE, H. E. and HANCHEY, P.: *Phytopathology* **56** : 1178-1183, 1966.
12. 山本昌木・大船重幸・中尾清隆・野津幹雄：日本植物病理学会 49年度大会要旨 A48, 1974.
13. YAMAMOTO, M., NOZU, M., MORI, M., YAJIMA, T. and TATEISHI, M.: *Jub. Vol. Comm. 60th Birthday Dr. N. HIRATSUKA. Rept. Tottori Mycol. Inst. (Japan)* **10** : 569-584, 1973.

Summary

The potato leaf tissues infected with *Phytophthora infestans* (Mont.) DeBary, and treated with the culture filtrate of *P. infestans* (Race 1) were investigated by means of electron-microscope (HS-6). The leaf tissues were fixed with 6.25% glutaraldehyde for 4 hours and fixed again with 4% osmium tetroxide solution for 3 hours.

The cell wall of the mycelia of *P. infestans* was composed of inner and outer layers. Mitochondria, nuclei, ER and vacuoles were observed in the hyphae. Fungal hyphae were observed in the intercellular space and in the suscept cells (cultivar Irish Cobbler, Katahdin and Norin No. 1) infected by *P. infestans*. Mucilaginous substance was observed on the suscept cell wall contacted by the fungal hyphae.

In the cells of potato tissues infected by the fungus, substance in low electron density was observed in the nuclear matrix, and the disappearance of nuclear membrane was recognized. Disintegration of chloroplast membrane and the swelling of the grana structure was observed in the infected cells. Osmiophilic granules were also recognized in the chloroplast, but starch grains were not observed. Decreased number of cristae was recognized in the mitochondria and microbody membrane disappeared. Sometimes

plasmolysis was observed in the suscep cells.

Browning occurred in the potato tuber slices—Norin No. 1 and interspecific hybrid 1506-b(9)—treated with the culture filtrate. Wilt and necrosis was observed by the treatment of the culture filtrate on potato leaves (Norin No. 1 and interspecific hybrid 1506-b(9)).

Although curved grana structure was observed in the chloroplast. Tonoplast was destroyed in the potato cells treated with the culture filtrate. Accumulation of high electron-dense substance was recognized around the cell wall of interspecific hybrid 1506-b(9) treated with the culture filtrate of *P. infestans*, but this phenomenon was not observed in the case of treating cultivar Norin No. 1 with the culture filtrate. Plasmolysis was not observed in the cells of both cultivars treated with the culture filtrate.











